

~~34/LP/PTK/08/2015~~

LAPORAN AKHIR
Insentif Riset SINas 2013

**Media Porus Berbasis Polimer Alam dan
Biokeramik Untuk Pertumbuhan Tulang:
Sintesis, Karakterisasi, dan Pengujian Pra-Klinik**

No. Identitas: RD-2013-0881

Bidang Prioritas Iptek:
TEKNOLOGI MATERIAL

Jenis Insentif Riset:
RISET DASAR (RD)

Tim Peneliti:
**ABDUL HALIM DAULAY
BAMBANG SUNENDAR PURWASASMITA
MUHAMMAD RIFQI AUFAN
DECKY JUSIANA INDRANI**

INSTITUT AGAMA ISLAM NEGERI SUMATERA UTARA

Jl. Willem Iskandar Pasar V Medan Estate, 20371

Telp: (061) 6615683; 6622925, Fax: (061) 6615683

e-mail: webmaster@iainsu@yahoo.com

1 NOVEMBER 2013

LAPORAN AKHIR

Insentif Riset SINas 2013

Media Porus Berbasis Polimer Alam dan
Biokeramik Untuk Pertumbuhan Tulang:
Sintesis, Karakterisasi, dan Pengujian Pra-Klinik

No. Identitas: RD-2013-0881

Bidang Prioritas Iptek:
TEKNOLOGI MATERIAL

Jenis Insentif Riset:
RISET DASAR (RD)

Tim Peneliti:

ABDUL HALIM DAULAY
BAMBANG SUNENDAR PURWASASMITA
MUHAMMAD RIFQI AUFAN
DECKY JUSIANA INDRANI

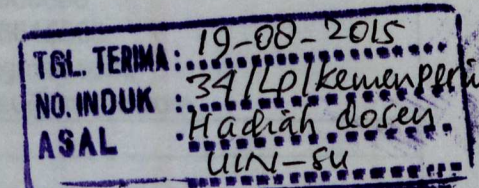
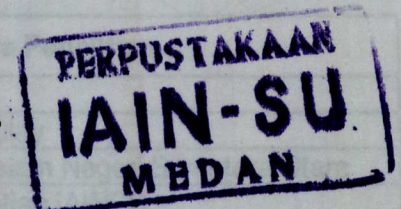
INSTITUT AGAMA ISLAM NEGERI SUMATERA UTARA

Jl. Williem Iskandar Pasar V Medan Estate, 20371

Telp: (061) 6615683; 6622925, Fax: (061) 6615683

e-mail: webmasteriainsu@yahoo.com

1 NOVEMBER 2013



P
548.81
MED
e.1

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Topik Penelitian Insentif Riset SINas Tahun 2013:
**Media Porus Berbasis Polimer Alam dan Biokeramik
Untuk Pertumbuhan Tulang: Sintesis, Karakterisasi, dan Pengujian Pra-Klinik**

Pengusul wajib memilih dengan melingkari nomor yang sesuai untuk hal berikut,

Bidang Prioritas Iptek:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Teknologi Pangan | 5. Teknologi Informasi dan Komunikasi |
| 2. Teknologi Kesehatan dan Obat | 6. Teknologi Pertahanan dan Keamanan |
| 3. Teknologi Energi | 7. Teknologi Material |
| 4. Teknologi Transportasi | |

Jenis Insentif Riset:

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Riset Dasar (RD) | 3. Riset Peningkatan Kapasitas Iptek Sistem Produksi (KP) |
| 2. Riset Terapan (RT) | 4. Percepatan Difusi dan Pemanfaatan Iptek (DF) |

Lokasi Penelitian:

Laboratorium Pemrosesan Material, Departemen Teknik Fisika, Institut Teknologi Bandung

Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian

A. Lembaga Pelaksana Penelitian

Nama Peneliti Utama	Abdul Halim Daulay
Nama Lembaga/Institusi	Institut Agama Islam Negeri Sumatera Utara
Unit Organisasi	Lembaga Penelitian IAINSU
Alamat	Jl. Williem Iskandar Psr V Medan Estate 20371
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	Telp. (+6261) 6615683, 6622925 HP. +6285220860088 Faks. (+6261) 6615683 halim.daulay@gmail.com, webmasteriainsu@yahoo.com

B. Anggota Konsorsium

Nama Pimpinan Lembaga/Mitra Industri	-
Nama Lembaga/Mitra Industri	-
Alamat	-
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	-

Rekapitulasi Biaya:

No.	Uraian	Jumlah (Rp)
1.	Gaji dan Upah	82.000.000
2.	Bahan Habis Pakai	19.400.500
3.	Perjalanan (tidak untuk perjalanan luar negeri)	12.600.000
4.	Lain-Lain	135.999.500
Jumlah Biaya Tahun yang Diusulkan		250.000.000

Setuju Diusulkan:

Peneliti Utama,

Dr. Nur A. Fadhil Lubis, M.A.

Dr. Nur A. Fadhil Lubis, M.A.

Abdul Halim Daulay, S.T., M.Si.

Abdul Halim Daulay, S.T., M.Si.

KATA ABSTRAK

Terbatasnya jumlah donor untuk aplikasi klinik transplantasi tulang merupakan masalah serius di dunia kedokteran. Berbagai penelitian ilmiah di bidang rekayasa jaringan terus menerus dilakukan dalam beberapa tahun belakangan ini sebagai usaha untuk memperoleh alternatif material pengganti yang dapat mengatasi keterbatasan jumlah donor tersebut. Pada penelitian ini, akan dilakukan sintesis media porus untuk pertumbuhan tulang berbasis polimer alam dan biokeramik. Alginat dan kitosan dipilih sebagai polimer alam yang akan digunakan karena keduanya bersifat kompatibel dan mampu terdegradasi dalam jaringan biologi, serta ketersediaan bahan dasarnya yang melimpah di perairan Indonesia. Keramik yang akan digunakan adalah karbonatapatit, hal ini merujuk pada sifat osteo-konduktif yang sangat baik yang dimilikinya dan karena ia merupakan komponen utama penyusun tulang. Karbonatapatit dipreparasi melalui metode ko-presipitasi. Metode yang digunakan untuk menghasilkan pori pada media pertumbuhan tulang adalah *freeze drying* dan *electrospinning*. Dengan cara ini, akan dihasilkan pori yang menyerupai bentuk lingkungan mikro dari sel tulang sehingga dapat meningkatkan interaksi antarmuka dan mendukung terjadinya proliferasi sel. Keterbaruan pada penelitian ini adalah pada penggunaan alginat dan kitosan sebagai media dan pemodifikasi permukaan. Modifikasi permukaan menggunakan alginat dilakukan agar permukaan media menjadi bersifat lebih fleksibel sehingga dapat digunakan untuk memperbaiki jaringan tulang dengan tingkat fleksibilitas yang sesuai. Modifikasi permukaan menggunakan kitosan dilakukan untuk meningkatkan kekuatan mekanik sekaligus sebagai surfaktan untuk meningkatkan jumlah karbonatapatit yang terikat sehingga mampu meningkatkan sifat bioaktif dari media porus. Selanjutnya, akan dilakukan karakterisasi sifat dan mikrostruktur serta dilakukan pengujian pra-pra-klinik (*in-vitro*) dan pra-klinik (*in-vivo*). Keberhasilan penelitian ini diharapkan akan mampu mengatasi keterbatasan jumlah donor sekaligus meningkatkan kemandirian nasional sehingga tidak tergantung pada produk impor, khususnya di bidang biomaterial.

Kata-kata kunci: *electrospinning*, *freeze drying*, karbonatapatit, ko-presipitasi, dan media porus.

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas rahmat, kasih sayang, petunjuk, dan ridho-Nya maka laporan akhir Penelitian Program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (SINas) tahun 2013 yang berjudul *Media Porus Berbaris Polimer Alam dan Biokeramik Untuk Pertumbuhan Tulang: Sintesis, Karakterisasi, dan Pengujian Pra-Klinik* dapat diselesaikan.

Kendala dan masalah yang dihadapi tim peneliti dapat dilalui berkat dukungan dari berbagai pihak. Sebab itu, diucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Gusti Muhammad Hatta selaku Menteri Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah menetapkan sekaligus menyetujui judul penelitian yang tim peneliti ajukan pada Program Insentif Riset SINas untuk didanai di tahun anggaran 2013 ini.
2. Prof. Dr. Nur A. Fadhil Lubis, M.A. selaku Rektor Institut Agama Islam Negeri Sumatera Utara yang telah mengizinkan dan mendukung tim peneliti untuk mengikuti Penelitian Program Insentif Riset SINas Tahun 2013.
3. Prof. Dr. Bambang Sunendar Purwasasmita, M.Eng. selaku Kepala Laboratorium Pemrosesan Material Maju Institut Teknologi Bandung atas dukungan, motivasi, dan masukan yang sangat berarti bagi pelaksanaan penelitian ini serta yang telah mengizinkan dilaksanakannya kegiatan riset ini di laboratorium tersebut.
4. Tim Monitoring dan Evaluasi (MonEv) internal Institut Agama Islam Negeri Sumatera Utara terkait dengan masukan yang diberikan.
5. Keluarga besar kami tersayang, atas kesabaran, perhatian, dukungan, serta doa yang diberikan.
6. Segenap pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas peran sertanya dalam penyelesaian laporan akhir Penelitian Program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (SINas) tahun 2013 ini.

semoga segala bantuan yang diberikan dicatat oleh Allah SWT sebagai amal baik dan dibalas dengan balasan yang berlipat ganda.

Dengan segala kerendahan hati, tim peneliti menerima kritik dan saran yang bersifat membangun untuk penyempurnaan laporan penelitian ini. Semoga apa yang telah ditulis dalam laporan penelitian ini dapat bermanfaat.

Medan, November 2013

Tim Peneliti

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
ABSTRAK.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Prospek dan Dampak Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Rekayasa Jaringan.....	5
2.2. Media Pertumbuhan Tulang (<i>Extra Cellular Matrix</i> , ECM).....	6
2.3. Alginat.....	7
2.4. Kitosan.....	8
2.5. Karbonat Apatit.....	8
2.6. <i>Freeze-drying</i>	9
2.7. <i>Electrospinning</i>	11
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT.....	12
3.1. Tujuan dan Sasaran Penelitian.....	12
3.2. Manfaat Penelitian.....	12
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN.....	13
4.1. Bahan dan Peralatan.....	13
4.2. Teknik Preparasi.....	13
4.2.1. Preparasi Larutan Sodium Alginat.....	13
4.2.2. Preparasi Larutan Kitosan.....	13
4.2.3. Preparasi Larutan Kalsium Karbonat.....	14
4.2.4. Sintesis Sol Hidroksiapatit.....	15
4.3. Metode Karakterisasi.....	16
BAB 5. RENCANA CAPAIAN, HASIL, DAN PEMBAHASAN.....	17
5.1. Sintesis Karbonatapatit.....	17
5.2. Sintesis Media Pertumbuhan Tulang Dengan Metode <i>Freeze-Drying</i>	18
5.3. Sintesis Media Pertumbuhan Tulang Dengan Metode <i>Electrospinning</i>	22

5.4. Tahapan Penelitian Selanjutnya (tahun ke-2).....	25
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	26
6.1. Kesimpulan.....	26
6.2. Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA	28

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Komponen enamel, dentin, dan tulang pada manusia dewasa, serta Hidroksiapatit dalam persen berat, kecuali untuk perbandingan molar Ca/P	9
Gambar 2.	Deasidifikasi kalsium menjadi kitosan	9
Gambar 3.	Densitas mineral selama pengeringan beku, dari kiri ke kanan: -196, -80, dan -20 °C. ⁽¹²⁾	10
Gambar 4.	Gambar penampang <i>confocal</i> , -80 (a), -50 (c), dan -20 °C (e), serta bentuk 3D dari alginat yang dibekukan pada temperatur -80 (b), -50 (d), dan -20 °C (f). ⁽¹³⁾	10
Gambar 5.	Proses keris alat <i>electrospinning</i> ⁽¹⁷⁾	13
Gambar 6.	Diagram alir persiapan larutan sodium alginat	13
Gambar 7.	Diagram alir persiapan larutan kitosan	14
Gambar 8.	Diagram alir persiapan larutan kalsium karbonat	14
Gambar 9.	Diagram alir sintesis sol hidroksiapatit	15
Gambar 10.	Pola XRD dari serbuk karbapatit setelah dikalsinasi pada temperatur 700 °C selama dua jam	17
Gambar 11.	(a) - (k) Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>freeze drying</i> dengan beberapa variasi penambahan alginat-kitosan dengan penambahan karbapatit dalam jumlah yang tetap	20
Gambar 12.	Mikrostruktur <i>cancellous trabecular bone</i> [http://en.wikipedia.org/wiki/FunBertazzo_S_-_SEM_deposition_trabecular_-_watu_m_-_x100.tif]	21
Gambar 13.	Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>freeze drying</i>	21
Gambar 14.	Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> dari campuran larutan PEO 4% dan larutan sodium alginat (a) 2%, (b) 3%, (c) 4%, dan (d) 5%, masing-masing dengan penambahan karbapatit dalam jumlah yang tetap	22
Gambar 15.	Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> dari campuran larutan PEO 4% dan larutan kitosan (a) 1%, (b) 2%, (c) 3%, (d) 4%, dan (e) 5%, masing-masing dengan penambahan karbapatit dalam jumlah yang tetap	23
Gambar 16.	Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> , (a) sampel dengan penggunaan larutan kitosan 3%, (b) sampel dengan penggunaan larutan sodium alginat 4%	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Komponen rekayasa jaringan.....	5
Gambar 2.	Alginat dengan struktur G dan M	7
Gambar 3.	Deasetilasi kitin menjadi kitosan	8
Gambar 4.	Derajat orientasi selama pengeringan beku, dari kiri ke kanan: -196, -80, dan -20 °C. ^[12]	10
Gambar 5.	Gambar penampang <i>scaffold</i> , -80 (a), -50 (c), dan -20 °C (e), serta bentuk 3D dari alginat yang dibekukan pada temperatur -80 (b), -50 (d), dan -20 °C (f). ^[15] ...	10
Gambar 6.	Proses kerja alat <i>electrospinning</i> ^[17]	11
Gambar 7.	Diagram alir preparasi larutan sodium alginat.....	13
Gambar 8.	Diagram alir preparasi larutan kitosan	14
Gambar 9.	Diagram alir preparasi larutan kalsium karbonat.....	14
Gambar 10.	Diagram alir sintesis sol hidroksiapatit.....	15
Gambar 11.	Pola XRD dari serbuk karbonatapatit setelah dikalsinasi pada temperatur 700 °C selama dua jam.....	17
Gambar 12.	(a) – (k) Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>freeze drying</i> dengan beberapa variasi pencampuran alginat-kitosan dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.....	20
Gambar 13.	Mikrostruktur <i>cancellous/trabecular bone</i> [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bertazzo_S_-_SEM_deproteined_trabecular_-_wistar_rat_-_x100.tif].....	21
Gambar 14.	Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>freeze drying</i>	21
Gambar 15.	Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> dari campuran larutan PEO 4% dan larutan sodium alginat (a) 2%, (b) 3%, (c) 4%, dan (d) 5%, masing-masing dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.	22
Gambar 16.	Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> dari campuran larutan PEO 4% dan larutan kitosan (a) 1%, (b) 2%, (c) 3%, (d) 4%, dan (e) 5%, masing-masing dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.	23
Gambar 17.	Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode <i>electrospinning</i> . (a) sampel dengan penggunaan larutan kitosan 3%, (b) sampel dengan penggunaan larutan sodium alginat 4%.	24

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan akan produk biomaterial di dunia meningkat setiap tahun. Berdasarkan laporan *Joint European Commission/ETP Nanomedicine Expert* (diakhir tahun 2009), pasar biomaterial pada tahun 2006 dan 2009 masing-masing adalah sebesar USD 39,6 Milyar dan USD 47 Milyar. Pada tahun 2015 dan 2025 nilai ini diprediksi akan meningkat tajam masing-masing menjadi USD 65 Milyar dan USD 113 Milyar^[1]. Faktor-faktor yang menyebabkan tingginya kebutuhan biomaterial antara lain: (i) tingginya jumlah kecelakaan lalu lintas; berdasarkan data badan kesehatan dunia PBB (WHO), angka kematian terbesar ketiga di Indonesia setelah HIV/AIDS dan TBC adalah kecelakaan lalu lintas yang mencapai 30 ribu orang per tahun, (ii) tingginya tingkat kecelakaan kerja, (iii) meningkatnya jumlah penderita kerapuhan tulang, serta (iv) banyaknya jumlah cacat bawaan.

Kerusakan sistem jaringan pada makhluk hidup, khususnya manusia, menjadi suatu pendorong dalam studi pengembangan biomaterial untuk keperluan penggantian jaringan yang rusak. Untuk itu perlu dicari metode-metode sintesis termasuk *medical treatment* yang biasanya menggunakan teknik implan yang melibatkan rekayasa jaringan. Beberapa metode yang umum dilakukan untuk transplantasi tulang ataupun jaringan lainnya adalah menggunakan jaringan yang berasal dari pasien itu sendiri (*autograft*), menggunakan jaringan dari orang lain atau pendonor (*allograft*), dan menggunakan jaringan dari hewan mamalia yang memiliki kemiripan dengan manusia seperti babi atau simpanse (*xenograft*)^[2]. Akan tetapi metode-metode tersebut mengalami keterbatasan dalam pengaplikasiannya baik berupa masalah ketersediaan donor, antigen, sakit dan trauma pasca operasi, maupun dalam hal biaya yang relatif sangat mahal.

Berbagai penelitian ilmiah dalam bidang rekayasa jaringan terus menerus dilakukan untuk mengembangkan material pengganti buatan yang tepat untuk transplantasi tulang atau jaringan lainnya, salah satunya dengan metode biomimetik. Biomimetik merupakan suatu ilmu pengetahuan dan teknologi yang terinspirasi dari proses dan desain alami untuk memecahkan masalah yang berkaitan dengan rekayasa jaringan^[3]. Dalam hal ini, ilmuwan dan *engineer* mencoba untuk melakukan rekayasa terhadap beberapa material, proses-proses yang dihasilkan oleh hewan dan tumbuhan, serta proses biomineralisasi dari pembentukan mineral sebagai konsep pemikiran yang berdasarkan hukum alam. Penelitian dan pengkajian yang terinspirasi dari alam menjadi tren belakangan ini, tercakup di dalamnya penelitian yang membahas hal-hal yang berkaitan dengan pemrosesan material maju, salah satunya dalam bidang pemrosesan biomaterial. Pencapaian di bidang biomaterial ini diantaranya adalah pembuatan material 2D dan

3D yang disusun dengan cara mengatur struktur porinya sebagai media pertumbuhan tulang (*extracellular matrix*, ECM). Material pengganti buatan untuk transplantasi tulang harus memenuhi kriteria sebagai berikut: (i) struktur berpori dengan luas permukaan yang besar, (ii) osteokonduktivitas yang baik sehingga memungkinkan terjadinya interaksi antarmuka yang aktif, (iii) kompatibel serta bersifat biodegradasi yang terkontrol, dan (iv) memiliki sifat mekanik tertentu^[3].

Bahan polimer alami dan buatan yang dapat digunakan sebagai ECM adalah kolagen, kitosan^[2], alginat, *poly lactic acid* (PLA), *polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate* (PHBV)^[4], *poly (ϵ -caprolactone)* (PCL)^[3], dan sebagainya. Kitosan merupakan turunan dari kitin melalui proses deasetilasi. Kitosan merupakan polisakarida nomor dua terbesar yang disintesis dari eksoskeleton hewan-hewan krustasea (udang, lobster, kepiting, dan sebagainya) dan dinding sel jamur. Kitosan memiliki sifat mekanik yang relatif baik, bersifat biokompatibel, biodegradabel, dan non-toksik. Kitosan telah digunakan untuk meningkatkan sifat-sifat mekanik dari polimer alam lainnya^[2] seperti keratin, *silk*, dan *starch*^[5]. Polimer alami berikutnya adalah alginat yang disintesis dari alga coklat. Alginat memiliki struktur berpori terbuka dan interkoneksi, bersifat biokompatibel, dan biodegradabel. Alginat telah digunakan dalam aplikasi medis diantaranya sebagai *wound-dress*. Alginat dapat pula digunakan untuk memodifikasi permukaan substrat sehingga menjadi lebih fleksibel. Dengan garis pantai terpanjang keempat di dunia (95.181 km)^[6], potensi ketersediaan bahan dasar kitosan dan alginat adalah sangat berlimpah di Indonesia serta berpeluang bagi peningkatan pendapatan masyarakat, khususnya di daerah pesisir.

Terdapat pula bahan keramik bioaktif yang dapat digunakan sebagai pengganti tulang, yaitu kalsium fosfat dan *bio-glass*. Termasuk senyawa-senyawa kalsium fosfat (apatit) yang sering digunakan sebagai pengganti tulang adalah Hidroksiapatit (HAp), α -trikalsium fosfat (α -TCP), dan (β -TCP). Hidroksiapatit merupakan penyusun utama dari tulang, memiliki osteokonduktivitas yang cukup tinggi, dan bersifat biodegradabel^[7]. Hidroksiapatit yang dimodifikasi dengan penambahan kalsium karbonat untuk meningkatkan jumlah ion karbonat (CO_3^{2-}) dalam jumlah tertentu disebut sebagai karbonatapatit. Karbonatapatit merupakan biokeramik yang terbukti memiliki osteokonduktivitas tinggi dan dapat terdegradasi. Penggunaan karbonatapatit dalam aplikasi rekayasa jaringan tulang lebih sesuai jika dibandingkan hidroksiapatit karena secara kimiawi lebih menyerupai apatit tulang dan memiliki laju resorpsi yang lebih tinggi^[7]. Karbonatapatit memiliki kelemahan pada sifat mekaniknya yang tidak begitu baik. Oleh karena itu, untuk mendapatkan produk dengan sifat mekanik sekaligus interaksi terhadap jaringan yang optimal maka dapat dipertimbangkan untuk

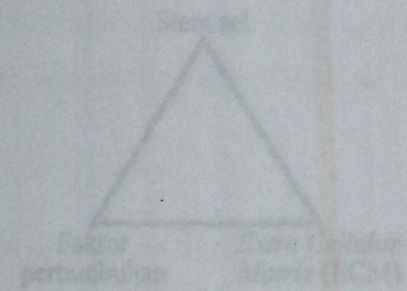
melakukan penggabungan antara bahan polimer dan keramik untuk menghasilkan suatu produk komposit.

Untuk saat ini, penelitian-penelitian yang menggunakan kombinasi alginat, kitosan, dan karbonatapatit secara bersama-sama belum pernah dilakukan sebelumnya. Pada penelitian ini, karbonatapatit dipreparasi melalui metode ko-presipitasi. Material biokomposit dibuat dengan mencampurkan alginat, kitosan, dan karbonatapatit dengan variasi komposisi tertentu. Metode yang digunakan untuk menghasilkan pori pada media pertumbuhan tulang adalah *freeze drying*^[8,9] dan *electrospinning*^[3,7,10,11]. Dengan cara ini, akan dihasilkan pori yang menyerupai bentuk lingkungan mikro dari sel tulang sehingga dapat meningkatkan interaksi antarmuka dan mendukung terjadinya proliferasi sel. Keterbaruan pada penelitian ini adalah pada penggunaan alginat dan kitosan sebagai media dan pemodifikasi permukaan serta karbonatapatit yang dijaga pada fasa amorf. Modifikasi permukaan menggunakan alginat dilakukan agar permukaan media menjadi bersifat lebih fleksibel sehingga dapat digunakan untuk memperbaiki jaringan tulang dengan tingkat fleksibilitas yang sesuai. Modifikasi permukaan menggunakan kitosan dilakukan untuk meningkatkan kekuatan mekanik sekaligus sebagai surfaktan untuk meningkatkan jumlah karbonatapatit yang terikat sehingga mampu meningkatkan sifat bioaktif dari media porus. Penggunaan karbonatapatit dalam fasa amorf bertujuan untuk meningkatkan kemampuan biodegradasi dalam jaringan hidup. Selanjutnya, akan dilakukan karakterisasi sifat dan mikrostruktur serta dilakukan pengujian pra-pra-klinik (*in-vitro*) dan pra-klinik (*in-vivo*).

1.2. Prospek dan Dampak Penelitian

Penelitian dan teknologi saat ini yang terkait dengan kegiatan riset yang dilakukan masih tergolong langka dilakukan di Indonesia. Minimnya penelitian menyebabkan sangat tingginya ketergantungan terhadap produk impor, khususnya produk biomaterial. Hal ini yang menjadi pendorong bagi tim peneliti untuk melakukan kegiatan riset dengan memanfaatkan bahan-bahan dasar lokal yang ketersediaannya melimpah di perairan Indonesia. Dampak hasil penelitian ini diharapkan dapat dirasakan oleh berbagai kalangan di Indonesia. Bagi dunia industri, diharapkan akan berdampak pada terciptanya sinergi/penelitian bersama antara lembaga penelitian dan mitra industri terkait produksi massal/komersialisasi hasil penelitian. Hal ini akan mendukung penguatan sistem inovasi nasional dimana kemandirian bangsa meningkat sehingga tidak tergantung pada produk impor. Dari segi ekonomi, akan tersedia alternatif produk biomaterial yang berasal dari bahan alami dengan bahan dasar lokal dengan harga yang relatif lebih murah yang terjangkau oleh daya beli masyarakat. Selain itu akan berpotensi pada terbukanya lapangan pekerjaan sehingga berpeluang untuk meningkatkan pendapatan dan taraf hidup masyarakat

pesisir, khususnya yang berkaitan dengan usaha budidaya dan pengolahan rumput laut dan hewan-hewan krustasea. Dengan dilaksanakannya kegiatan penelitian ini, diharapkan akan menginisiasi lahirnya penelitian-penelitian dengan topik terkait ataupun lanjutan, mendorong terjadinya sinergi penelitian antar lembaga riset, serta memacu kreativitas dan inovasi dalam kegiatan penelitian.



Gambar 1. Komponen rekayasa jaringan

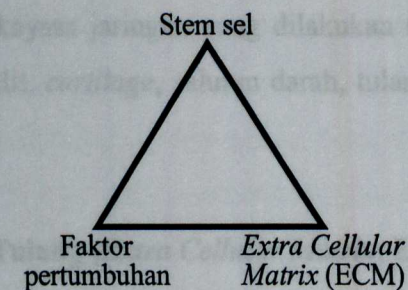
Stem sel merupakan sel yang berkembang dan berdiferensiasi untuk menggantikan sel-sel yang rusak atau mati. Sel-sel ini memiliki kemampuan untuk memperbaharui jaringan yang rusak. Sel-sel ini juga dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel yang berbeda-beda, seperti sel-sel darah, sel-sel tulang, sel-sel otot, dan sel-sel lainnya. Sel-sel ini juga dapat digunakan untuk mengobati penyakit-penyakit tertentu, seperti penyakit-penyakit degeneratif, penyakit-penyakit autoimun, dan penyakit-penyakit lainnya.

Salah satu tantangan dalam rekayasa jaringan adalah bagaimana menciptakan lingkungan yang mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel. Salah satu cara untuk mengatasi tantangan ini adalah dengan menggunakan scaffold. Scaffold adalah struktur tiga dimensi yang dapat mendukung pertumbuhan sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan sinyal-sinyal yang diperlukan untuk diferensiasi sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan mekanis untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan nutrisi untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan oksigen untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan suhu untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan pH untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan tekanan untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan magnet untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan listrik untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gravitasi untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan suara untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan cahaya untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang mikro untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang radio untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang inframerah untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang ultraviolet untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang gamma untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang kosmik untuk sel-sel. Scaffold juga dapat memberikan dukungan medan gelombang lainnya untuk sel-sel.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Rekayasa Jaringan

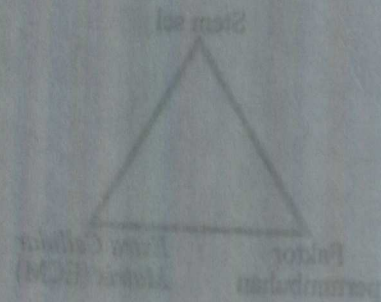
Rekayasa jaringan merupakan kajian multidisiplin yang mempelajari tentang perkembangan atau pertumbuhan jaringan atau organ secara *in-vitro* untuk mengganti atau mendukung fungsi dari bagian tubuh yang mengalami cacat atau kerusakan, atau merupakan manajemen terarah untuk perbaikan jaringan di dalam tubuh makhluk hidup (*in-vivo*). Terdapat tiga komponen penting pada rekayasa jaringan, yaitu: (i) stem sel, (ii) *extracellular matrix* (ECM), dan (iii) faktor-faktor pertumbuhan. Perhatikan Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Komponen rekayasa jaringan

Stem sel merupakan sel yang dikembangkan atau ditumbuhkan untuk meningkatkan regenerasi jaringan rusak yang akan diperbaiki atau diganti secara alami. Berdasarkan sumbernya, stem sel dapat berasal dari sel embrio manusia yang ditumbuhkan untuk menghasilkan suatu fungsi tertentu (*embryonic stem cells*), dari sel dewasa manusia yang telah memiliki suatu fungsi tertentu (*adult stem cells*), dan dari sel makhluk hidup lain (*progenitor stem cells*).

Media pertumbuhan tulang (*Extracellular matrix*, ECM) didefinisikan sebagai suatu pendukung, alat pengantar, atau matriks untuk memfasilitasi terjadinya migrasi, ikatan, atau transpor sel-sel atau molekul-molekul bioaktif yang digunakan untuk mengganti, memperbaiki, atau meregenerasi jaringan tulang. ECM berupa perangkat yang direkayasa dari bahan biomaterial dan didesain untuk fungsi-fungsi tertentu. Fungsi-fungsi ini harus dihasilkan oleh ECM secara *in-vitro* selama kultur sel dan ketika diaplikasikan secara *in-vivo* setelah proses implantasi. Bahan biomaterial yang digunakan sebagai ECM adalah polimer alam, polimer buatan, keramik, dan komposit. Contoh polimer alam yang biasa digunakan adalah kolagen, alginat, gelatin, kitosan, dan sebagainya. Polimer buatan berupa *Polylactic acid* (PLA), *Polyglycolic acid* (PGA), *Poly(ϵ -caprolactone)* (PCL), dan lain-lain. Keramik berupa trikalsium fosfat (TCP), hidroksiapatit, bioglass, dan lain-lain. Sedangkan komposit dapat berupa penggabungan antara bahan polimer dan keramik tersebut.



Gambar 1. Komponen rekayasa jaringan

Faktor-faktor pertumbuhan pada rekayasa jaringan mencakup beberapa hal, yaitu: (1) biokompatibel, berkaitan dengan kompatibilitas pada jaringan hidup, tidak menimbulkan respon benda asing (*foreign body response*), dan tidak beracun; (2) bioaktif, berkaitan dengan inkorporasi jaringan lama dengan jaringan baru yang berupa pelekatan sel (*cell adhesion*) dan stimulasi pertumbuhan sel; (3) biodegradasi, berkaitan dengan degradasi akibat terjadinya modifikasi secara kimia saat berinteraksi dengan lingkungan biologi; (4) sifat mekanik, berupa kekuatan, fleksibilitas, dan sebagainya; (5) organisasi, berupa pertumbuhan jaringan yang mengikuti struktur hierarkinya; dan (6) keserasian (*degree of mismatch*), berupa kecocokan bentuk dan lokasi.

Penelitian-penelitian rekayasa jaringan yang dilakukan saat ini meliputi beberapa jenis jaringan dan organ, seperti: kulit, *cartilage*, saluran darah, tulang, otot, syaraf, hati, ginjal, dan sebagainya.

2.2. Media Pertumbuhan Tulang (*Extra Cellular Matrix*, ECM)

Media pertumbuhan tulang (*Extracellular matrix*, ECM) adalah suatu pendukung, alat pengantar, atau matriks untuk memfasilitasi terjadinya migrasi, ikatan, atau transpor sel-sel atau molekul-molekul bioaktif yang digunakan untuk mengganti, memperbaiki, atau meregenerasi jaringan tulang. ECM dapat mengatur fungsi sel berdasarkan komposisi kimia pembentuknya dan strukturnya.

Komposisi kimia mempengaruhi pelekatan sel, interaksi sel, laju degradasi, dan sifat-sifat mekanik. Laju degradasi yang terlalu cepat menggagalkan proses regenerasi sel, sebaliknya laju degradasi yang lambat justru mengganggu *remodeling* sel sehingga prosesnya menjadi tidak efektif. Untuk mengatasi hal ini, polimer buatan dicampur dengan polimer lain yang memiliki perbedaan laju degradasi, sedangkan pada polimer alam dengan cara ikatan silang.

Struktur ECM meliputi persentase porositas, diameter pori, serta interkoneksi dan orientasi pori. Persentase porositas berkaitan dengan jumlah sel yang dapat dikandung dan kekuatan material, diameter pori berkaitan dengan luas permukaan dan sel yang melekat serta kemampuan sel untuk berinfiltrasi pada pori. Interkoneksi dan orientasi pori berkaitan dengan arah pertumbuhan sel.

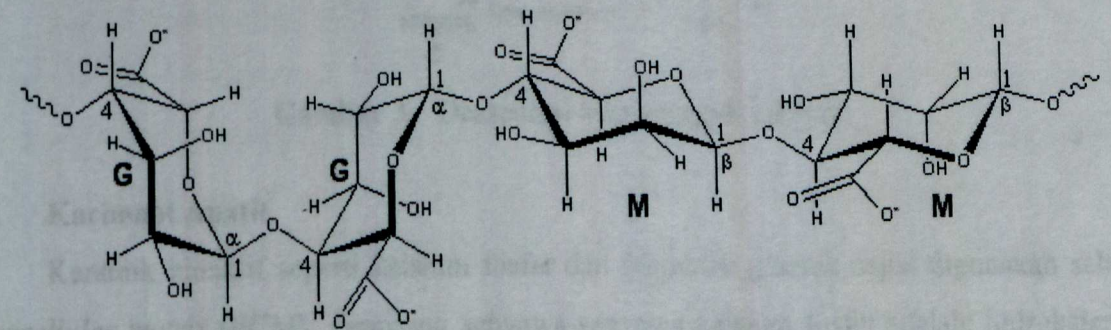
Geometri dari ECM dapat berupa: film, *foam*, *hydrogel*, jejaring (*woven*, *non-woven*), partikel, dan material injeksi. Metode yang biasa digunakan untuk membuat ECM adalah: serat (*woven*, *non-woven*), *freeze-drying*, *self-assembly*, dan *free-form manufacturing*.

2.3. Alginat

Alginat merupakan suatu istilah yang digunakan untuk garam dari asam *alginic*, atau merujuk pada turunan dari asam *alginic*, atau dapat berupa asam *alginic* itu sendiri. Alginat terdapat pada dinding sel dari alga coklat sebagai garam kalsium, garam magnesium, dan garam sodium dari asam alginic. Tujuan dari proses ekstraksi adalah untuk memperoleh serbuk kering sodium alginat, karena garam sodium dapat terlarut dalam air sedangkan garam kalsium dan garam magnesium tidak terlarut.

Penggunaan alginat berdasarkan tiga sifat utamanya. Pertama adalah kemampuannya untuk meningkatkan viskositas larutan yang mengandung air. Sifat kedua adalah kemampuannya untuk membentuk gel. Gel terbentuk saat garam kalsium ditambahkan pada larutan sodium alginat dalam air. Pembentukan gel adalah dengan reaksi kimia dimana kalsium menggantikan posisi sodium pada alginat. Proses pembentukan gel ini tidak membutuhkan pemanasan dan gel tidak meleleh jika dipanaskan. Hal ini sangat berbeda dengan gel yang berasal dari agar dimana air harus dipanaskan hingga temperatur sekitar 80°C untuk melarutkan agar dan gel terbentuk ketika temperatur diturunkan di bawah sekitar 40°C . Sifat ketiga alginat adalah kemampuannya untuk membentuk film sodium atau kalsium alginat dan serat kalsium alginat.

Molekul alginat merupakan rantai panjang yang mengandung dua komponen asam berbeda yang disebut β -(1 \rightarrow 4)-linked D-mannuronic acid (M) dan α -(1 \rightarrow 4)-linked L-guluronic acid (G). Susunan M dan G pada rantai serta rasio M/G dapat bervariasi dari satu spesies rumput laut dengan yang lainnya. Umumnya, alginat dengan kandungan G yang lebih tinggi (perbandingan M/G yang rendah) akan menghasilkan gel yang lebih kuat.



Gambar 2. Alginat dengan struktur G dan M

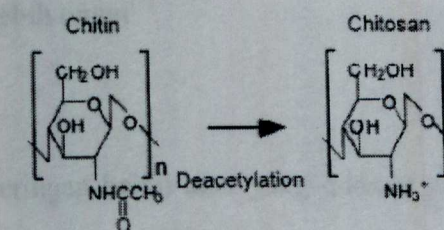
Jika larutan sodium alginat dicampurkan ke dalam larutan kalsium klorida dengan aliran/pancaran yang halus, akan dihasilkan serat kalsium alginat. Serat stabil dengan kualitas yang bagus diproses ke bentuk *non-woven* dan dapat digunakan sebagai *wound-dressing*. Produk *wound-dressing* memiliki sifat *haemostatic* dan *wound-healing* yang baik serta dapat diserap oleh cairan tubuh karena kalsium pada serat dipertukarkan dengan sodium dari cairan tubuh dan

menghasilkan sodium alginat yang dapat terlarut. Alginat juga dapat digunakan pada aplikasi *controlled-release* dari obat-obatan dan bahan kimia lainnya.

2.4. Kitosan

Kitosan merupakan turunan dari kitin melalui proses deasetilasi. Kitosan merupakan polisakarida nomor dua terbesar yang disintesis dari eksoskeleton hewan-hewan krustasea (udang, lobster, kepiting, dan sebagainya) dan dinding sel jamur. Kitosan mengandung unit berulang 1,4-linked 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosamine. Karena grup amino bebas yang dimilikinya, kitosan dapat terlarut pada larutan asam, membuatnya mudah untuk memproses material dengan teknik *solvent-assisted* seperti *solution casting*. Kitosan memiliki sifat mekanik yang relatif baik, selain itu ia juga bersifat biokompatibel, biodegradabel, non-toksik, dan *film forming*. Kitosan telah digunakan untuk meningkatkan sifat-sifat mekanik dari polimer alam lainnya seperti keratin, *silk*, dan *starch*^[5].

Kitosan digunakan berdasarkan tiga fungsi utamanya, yaitu: (i) *bonding agent*, sebagai surfaktan dengan fungsional grup amino yang menghasilkan ikatan yang kuat; (ii) dispersan, sebagai pendispersi partikel sehingga dapat terdistribusi secara homogen; (iii) flokulan, aplikasinya dalam penyalutan (obat-obatan dan bahan kimia lainnya) ataupun penggumpalan (misal: darah).



Gambar 3. Deasetilasi kitin menjadi kitosan

2.5. Karbonat Apatit

Keramik bioaktif seperti kalsium fosfat dan *bioactive glasses* dapat digunakan sebagai *extracellular matrix* (ECM). Termasuk senyawa-senyawa kalsium fosfat adalah: hidroksiapatit, α -trikalsium fosfat (α -TCP), dan β -trikalsium fosfat (β -TCP) yang sering digunakan sebagai pengganti tulang. Hidroksiapatit merupakan konstituen tulang utama yang memiliki osteokonduktivitas^[2].

Hidroksiapatit dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ memiliki rasio molar kalsium terhadap fosfat (Ca/P) adalah 1,67. Hidroksiapatit merepresentasikan komponen inorganik utama dari struktur tulang dan gigi^[4]. Perhatikan Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Komponen enamel, dentin, dan tulang pada manusia dewasa, serta Hidroksiapatit dalam persen berat, kecuali untuk perbandingan molar Ca/P

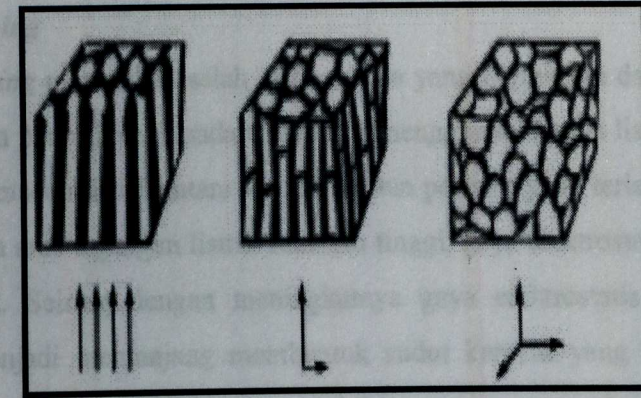
No.	Komponen	Enamel	Dentin	Tulang	Hidroksi apatit
1.	Ca^{2+}	36,5	35,1	34,8	39,6
2.	PO_4^{3-}	17,7	16,9	15,2	18,5
3.	Perbandingan molar Ca/P	1,63	1,61	1,71	1,67
4.	Na^+	0,5	0,6	0,9	-
5.	Mg^{2+}	0,44	1,23	0,72	-
6.	K^+	0,08	0,05	0,03	-
7.	CO_3^{2-}	3,5	5,6	7,4	-
8.	F^-	0,01	0,06	0,03	-
9.	Cl^-	0,30	0,01	0,13	-
10.	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	0,022	0,10	0,07	-
11.	Total inorganik	97,0	70,0	65,0	100
12.	Total organik	1,5	20,0	25,0	-
13.	H_2O terserap	1,5	10,0	10,0	-

Hidroksiapatit yang dimodifikasi dengan penambahan kalsium karbonat untuk meningkatkan jumlah ion karbonat (CO_3^{2-}) dalam jumlah tertentu disebut sebagai karbonatapatit. Karbonatapatit merupakan biokeramik yang terbukti memiliki osteokonduktivitas tinggi dan dapat terdegradasi. Penggunaan karbonatapatit dalam aplikasi rekayasa jaringan tulang lebih sesuai jika dibandingkan hidroksiapatit karena secara kimiawi lebih menyerupai apatit tulang dan memiliki laju resorpsi yang lebih tinggi^[7].

2.6. Freeze-drying

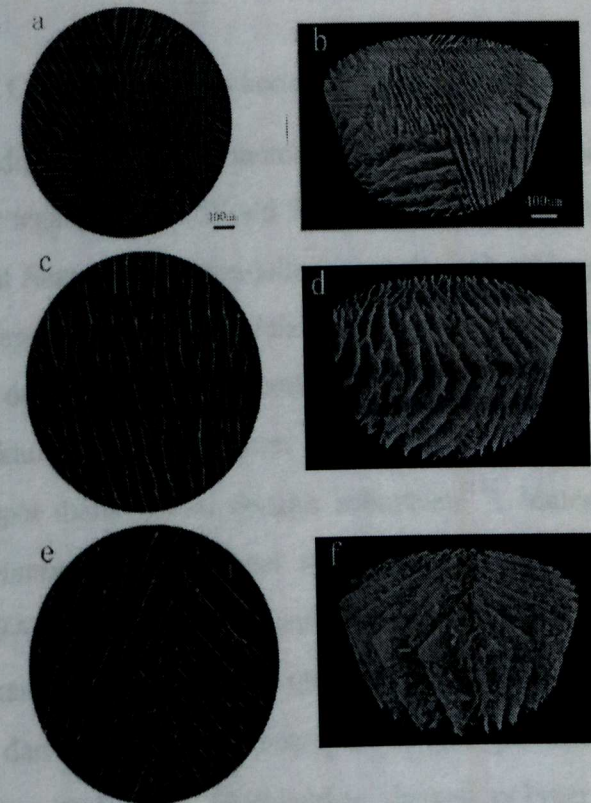
Freeze drying (pengeringan beku) atau yang dikenal juga dengan nama *lyophilization* (*cryodesiccation*) merupakan proses dehidrasi, yang umumnya digunakan untuk pengawetan makanan^[12]. *Freeze drying* bekerja dengan cara sampel dibekukan, kemudian dikurangi tekanan di sekitarnya agar air pada sampel membeku menjadi es, proses penyubliman terjadi secara langsung dari fasa padat ke fasa gas tanpa melewati fasa cair. Kristal es yang terbentuk selama pembekuan menciptakan pori-pori di dalam sampel 3D. Proses sublimasi berikutnya adalah dihasilkannya media berpori dari kristal yang terbentuk pada proses pembekuan^[13].

No.	Komponen	Enamel	Dentin	Tulang	Hidroksiapatit
1.	Ca ²⁺	36.5	35.1	34.8	34.6
2.	PO ₄ ³⁻	17.7	16.9	15.2	15.2
3.	Perbandingan molar Ca/P	1.83	1.61	1.71	1.60
4.	Na ⁺	0.2	0.0	0.0	-
5.	Mg ²⁺	0.44	1.23	0.75	-
6.	K ⁺	0.02	0.02	0.03	-
7.	CO ₃ ²⁻	3.5	3.0	3.8	-
8.	F ⁻	0.01	0.00	0.00	-
9.	Cl ⁻	0.30	0.01	0.13	-
10.	P-O ²⁻	0.023	0.10	0.07	-
11.	Total inorganik	97.0	70.0	65.0	100
12.	Total organik	1.3	20.0	23.0	-
13.	H ₂ O terikat	1.5	10.0	10.0	-



Gambar 4. Derajat orientasi selama pengeringan beku, dari kiri ke kanan: -196, -80, dan -20 °C.^[12]

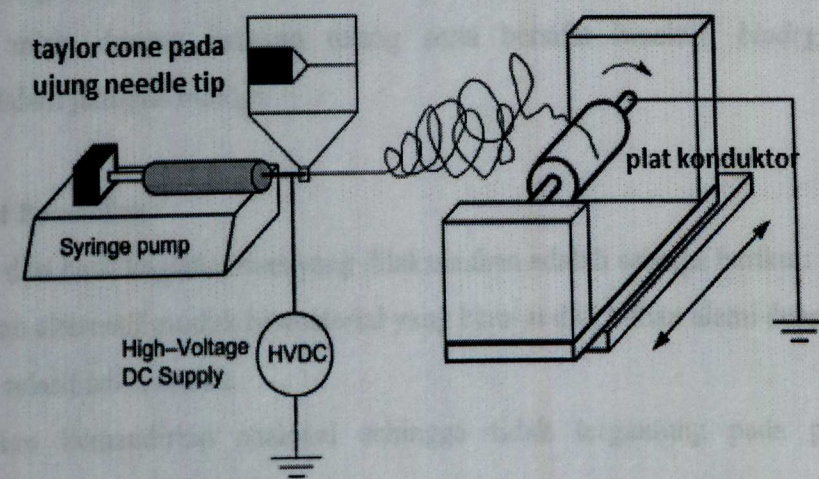
Proses pembekuan mempengaruhi ukuran pori 3D pada sampel, temperatur -20 °C membentuk ukuran pori pada sampel sekitar 250 – 300 µm dengan ketebalan dinding yang tipis dan menghasilkan media dengan struktur yang lemah serta rapuh. Ketika temperatur diturunkan menjadi -80 hingga -196 °C, ukuran pori pada media menjadi lebih kecil yaitu 45-50 µm dengan ketebalan dinding yang lebih tebal^[14]. Pada penelitian ini digunakan temperatur -40° C untuk menghasilkan pori sekitar 60 – 300 µm yang merupakan standar ukuran pori komersil. Terjadinya perbedaan ukuran pori dan struktur bagian dalam mencerminkan adanya perbedaan tingkat perpindahan panas selama proses pembekuan.



Gambar 5. Gambar penampang *scaffold*, -80 (a), -50 (c), dan -20 °C (e), serta bentuk 3D dari alginat yang dibekukan pada temperatur -80 (b), -50 (d), dan -20 °C (f).^[15]

2.7. Electrospinning

Electrospinning merupakan salah satu metode yang digunakan dalam proses pembuatan serat fiber berukuran nano. Proses pada Gambar 6 menggunakan arus listrik bertegangan tinggi untuk menciptakan medan listrik antara tetesan larutan polimer yang terletak di ujung jarum dan plat kolektor. Ketika arus tegangan listrik semakin tinggi, gaya elektrostatis pada tetesan larutan semakin meningkat. Seiring dengan meningkatnya gaya elektrostatis pada larutan, larutan berubah bentuk menjadi memanjang membentuk sudut kerucut yang disebut dengan *Taylor cone*^[16]. Ketika besar gaya elektrostatis melebihi tegangan permukaan pada tetesan, ujung kerucut akan menginjeksikan serat-serat tipis larutan terus menerus menuju plat kolektor.



Gambar 6. Proses kerja alat *electrospinning*^[17]

Peralatan yang digunakan dalam metode *electrospinning* adalah jarum *syringe* yang dihubungkan ke sumber tegangan DC (5V s/d 5kV), pompa *syringe*, dan plat kolektor. Alat ini mengeluarkan serat-serat fiber yang terjalin-jalin ke segala arah sehingga membentuk pori-pori. Alat *electrospinning* dapat diaplikasikan dalam pembuatan membran porous^[16]. Kelebihan metode *electrospinning* dalam pembuatan membran porous adalah struktur yang dibentuk dapat meniru morfologi struktur matriks sel, serat yang terjalin-jalin, dan menghasilkan ukuran diameter fiber yang dapat diatur sesuai dengan kebutuhan^[18]. Material yang bisa digunakan dalam proses *electrospinning* adalah polimer sintesis murni dan polimer campuran. Polimer sintesis seperti PET, PVA, dan PEO adalah jenis polimer yang sering digunakan dalam bidang biomaterial^[19]. Sedangkan polimer campuran merupakan larutan gabungan dari bahan polimer alami seperti kitosan dan alginat yang dicampur dengan polimer sintesis. Dalam proses *electrospinning*, polimer alami harus ditambahkan dengan polimer sintesis karena polimer sintesis membantu untuk menurunkan konduktivitas muatan polisakarida dan meningkatkan kekuatan ikatan polimer sehingga larutan dapat diubah menjadi serat fiber^[20].

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

3.1. Tujuan dan Sasaran Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan, yaitu sebagai berikut:

- Menghasilkan media pertumbuhan tulang berbasis polimer alam dan biokeramik.
- Mengetahui hasil karakterisasi sifat dan mikrostruktur dari media porus yang dihasilkan.
- Mengetahui hasil uji pra-pra-klinik (*in-vitro*) dan pra-klinik (*in-vivo*) dari media porus yang dihasilkan.

Sasaran yang ingin dicapai melalui penelitian ini adalah dihasilkannya media porus untuk pertumbuhan tulang berbasis polimer alam dan biokeramik dengan karakteristik sifat fisik dan mekanik yang mirip dengan jaringan tulang serta bersifat bioaktif, *biodegradable*, dan biokompatibel dalam jaringan biologi.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat dari hasil kegiatan riset yang dilaksanakan adalah sebagai berikut:

- Menyediakan alternatif produk biomaterial yang berasal dari bahan alami dengan harga yang diharapkan relatif lebih murah.
- Meningkatkan kemandirian nasional sehingga tidak tergantung pada produk impor, khususnya di bidang biomaterial.
- Berkontribusi secara tidak langsung pada terbukanya lapangan pekerjaan sehingga berpeluang untuk meningkatkan pendapatan dan taraf hidup masyarakat pesisir, khususnya yang berkaitan dengan usaha budidaya dan pengolahan rumput laut dan hewan-hewan krustasea.

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Bahan dan Peralatan

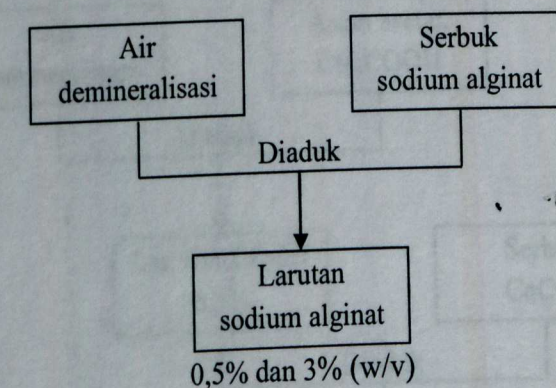
Bahan-bahan dan peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Biopolimer: sodium alginat dan kitosan.
- Bahan kimia: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH , CaCl_2 , CH_3COOH , dan CaCO_3 .
- Air yang digunakan adalah air demineralisasi dan air deionisasi.
- Peralatan penelitian: pH meter, termometer, Ultra Turax™, Ultrasonic Homogenizer, Ultrasonic Bath, perangkat *freeze-drying*, dan perangkat *electrospinning*.
- Peralatan karakterisasi: *Scanning Electron Microscope* (SEM), *X-ray Diffractometer* (XRD), *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) *Spectroscopy*, dan perangkat Brunauer-Emmett-Teller (BET) *Characterization*.

4.2. Teknik Preparasi

4.2.1. Preparasi Larutan Sodium Alginat

Larutan sodium alginat diperoleh dengan cara mengaduk serbuk sodium alginat ke dalam air demineralisasi. Untuk penggunaan sebagai modifikasi permukaan, larutan sodium alginat dibuat dengan konsentrasi 0,5% (w/v). Sedangkan untuk penggunaan sebagai templat, konsentrasinya adalah 3% (w/v). Diagram alir preparasi larutan sodium alginat dapat dilihat pada Gambar 7.

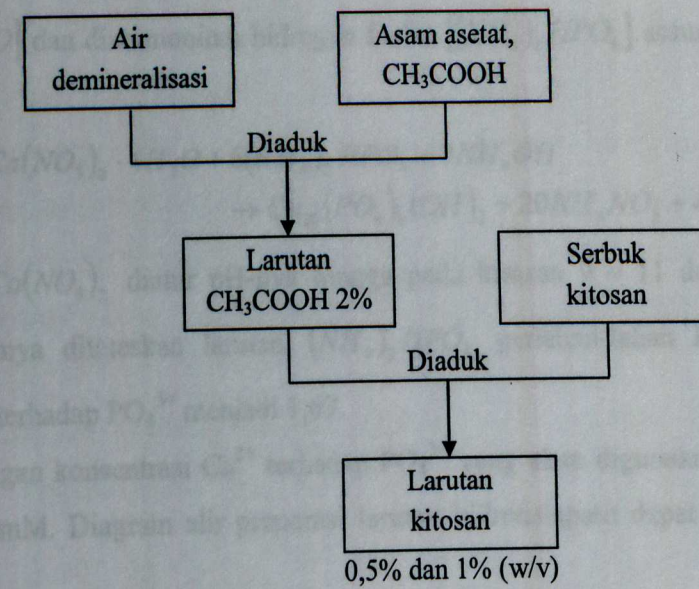


Gambar 7. Diagram alir preparasi larutan sodium alginat

4.2.2. Preparasi Larutan Kitosan

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan kitosan adalah larutan asam asetat 2% (v/v). Serbuk kitosan dengan berat molekul tinggi dan derajat deasetilasi 75% diaduk ke dalam larutan asam asetat hingga dihasilkan larutan kitosan dengan konsentrasi 0,5% (w/v) untuk penggunaannya sebagai modifikasi permukaan. Sedangkan untuk penggunaan sebagai templat,

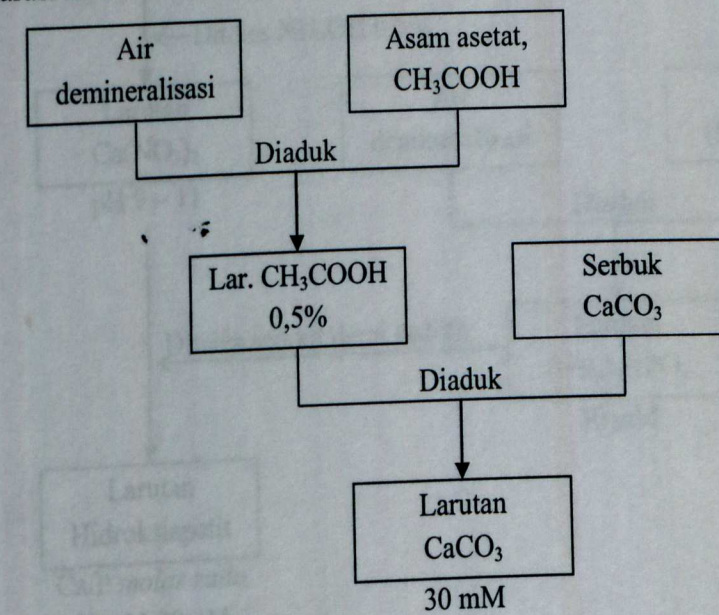
konsentrasinya adalah 1% (w/v). Diagram alir preparasi larutan kitosan dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir preparasi larutan kitosan

4.2.3. Preparasi Larutan Kalsium Karbonat

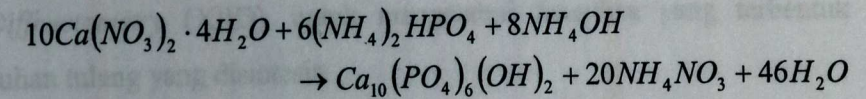
Kalsium karbonat [CaCO_3] hampir tidak terlarut pada pelarut air. Untuk melarutkannya dapat digunakan larutan asam. Pada penelitian ini akan digunakan pelarut berupa larutan asam asetat [CH_3COOH] 0,5% dan konsentrasi larutan kalsium karbonat yang dibuat adalah 30 mM. Diagram alir preparasi larutan kalsium karbonat dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir preparasi larutan kalsium karbonat

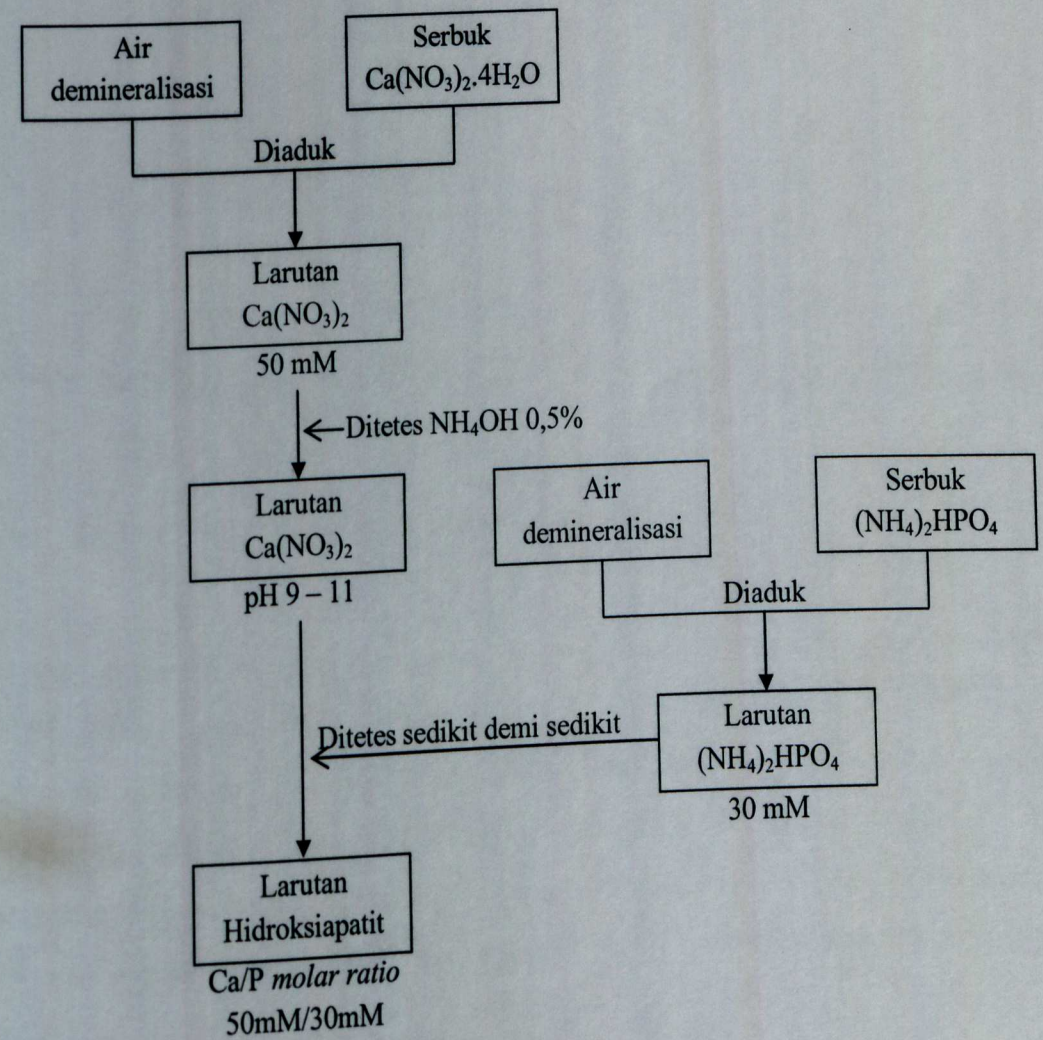
4.2.4. Sintesis Sol Hidroksiapatit

Larutan hidroksiapatit dibuat dengan cara mereaksikan garam kalsium $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ dan diammonium hidrogen fosfat $[(NH_4)_2HPO_4]$ sesuai dengan persamaan reaksi berikut:



Larutan $Ca(NO_3)_2$ diatur pH-nya hingga pada kisaran 9 – 11 dengan menambahkan amonia. Selanjutnya ditetaskan larutan $(NH_4)_2HPO_4$ perlahan-lahan hingga perbandingan konsentrasi Ca^{2+} terhadap PO_4^{3-} menjadi 1,67.

Perbandingan konsentrasi Ca^{2+} terhadap PO_4^{3-} yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 50mM/30mM. Diagram alir preparasi larutan hidroksiapatit dapat dilihat pada Gambar 10.

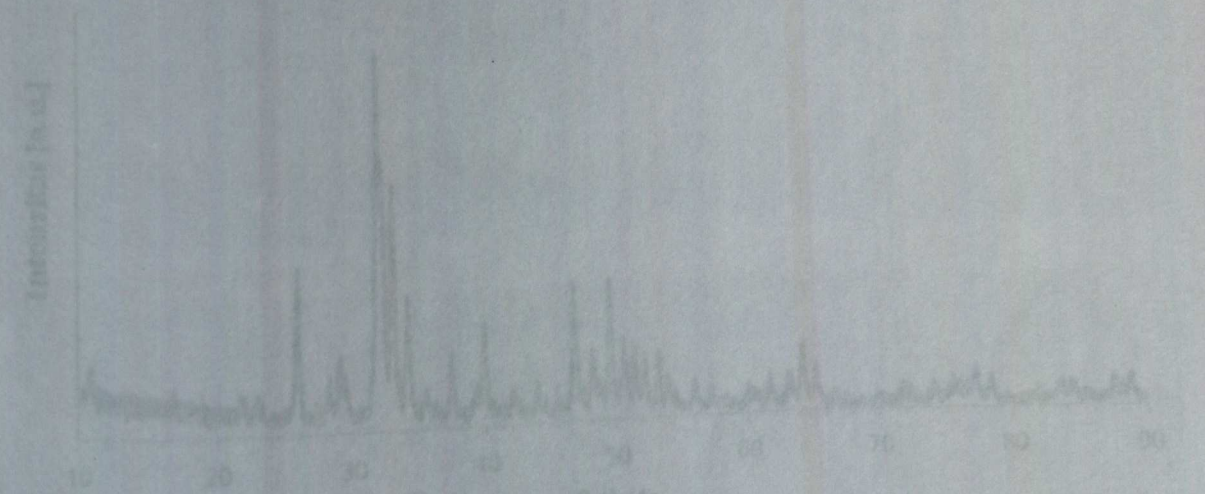


Gambar 10. Diagram alir sintesis sol hidroksiapatit

4.3. Metode Karakterisasi

Pada kegiatan riset ini, metode karakterisasi yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Scanning Electron Microscopy* (SEM), untuk melihat morfologi mikrostruktur dari media pertumbuhan tulang yang disintesis.
- X-ray Diffraction* (XRD), untuk mengetahui fasa-fasa yang terbentuk pada media pertumbuhan tulang yang disintesis.
- Fourier Transform Infra Red* (FTIR) *Spectroscopy*, untuk mengetahui gugus fungsi dari media pertumbuhan tulang yang disintesis berupa gugus-gugus amine, hidroksil, karboksil, karbonat, dan fosfat.
- Brunauer-Emmet-Teller (BET) *Characterization*, untuk melihat luas permukaan dari karbonatapatit yang disintesis.



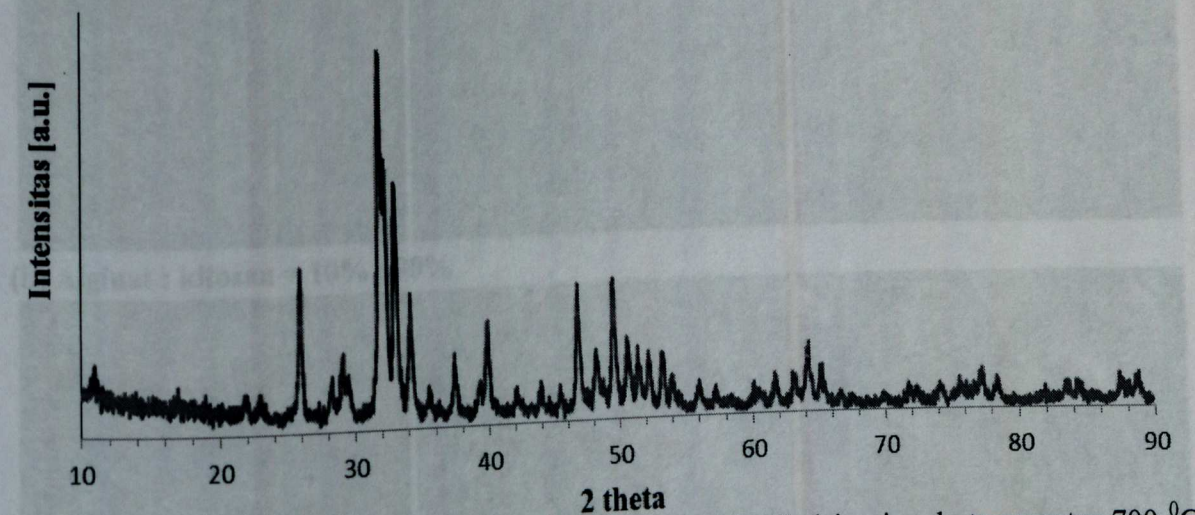
Gambar 11. Pola XRD dari karbonatapatit yang disintesis pada temperatur 700 °C.

Untuk analisis struktur kristal, digunakan XRD dengan menggunakan X-ray diffraksi. XRD adalah teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi struktur kristal suatu material. Dalam penelitian ini, XRD digunakan untuk mengidentifikasi struktur kristal dari karbonatapatit yang disintesis. Hasil XRD menunjukkan bahwa karbonatapatit yang disintesis memiliki struktur kristal yang sama dengan karbonatapatit alami. Hal ini menunjukkan bahwa sintesis karbonatapatit yang dilakukan dalam penelitian ini berhasil menghasilkan karbonatapatit yang memiliki struktur kristal yang sama dengan karbonatapatit alami.

BAB 5. RENCANA CAPAIAN, HASIL, DAN PEMBAHASAN

5.1. Sintesis Karbonatapatit

Pada penelitian ini, sumber karbonatapatit yang digunakan adalah serbuk karbonatapatit yang dihasilkan melalui proses solgel dengan metode ko-presipitasi. Karbonatapatit disintesis dengan cara mencampurkan larutan kalsium karbonat ke dalam sol hidroksiapatit dan dibiarkan selama beberapa hari pada temperatur kamar untuk membentuk endapan. Endapan putih yang berasal dari pencampuran tersebut selanjutnya dipisahkan dengan teknik sentrifugasi dan dikeringkan pada temperatur kamar. Akhirnya, serbuk kering yang diperoleh dikalsinasi pada temperatur 700°C dengan waktu penahanan selama dua jam. Hasil pengamatan menggunakan perangkat *X-ray Diffractometer* (XRD) dari serbuk yang dikalsinasi dapat dilihat Gambar 11 berikut:



Gambar 11. Pola XRD dari serbuk karbonatapatit setelah dikalsinasi pada temperatur 700°C selama dua jam.

Setelah dilakukan pengecekan pada database XRD menggunakan software XPowder, pola XRD di atas sesuai dengan pola difraksi dari karbonatapatit (PDF No. 190272). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa penggunaan metode sintesis di atas mampu menghasilkan karbonatapatit. Karakterisasi menggunakan perangkat Brunauer-Emmett-Teller (BET) menunjukkan bahwa serbuk karbonatapatit hasil sintesis memiliki luas permukaan sebesar $22,876 \text{ m}^2/\text{g}$, ukuran pori rata-rata sebesar $4,605 \times 10^2 \text{ \AA}$, dan volume pori total sebesar $2,634 \times 10^{-1} \text{ cc/g}$.

5.2. Sintesis Media Pertumbuhan Tulang Dengan Metode *Freeze-Drying*

Media pertumbuhan tulang disintesis dengan mencampurkan larutan sodium alginat 3% (w/v) dan larutan kitosan 1% (w/v) dengan variasi volume pencampuran tertentu yang disertai dengan penambahan serbuk karbonatapatit. Untuk menghasilkan media pertumbuhan tulang yang berpori, pada penelitian ini digunakan metode *freeze drying*. Berikut ini adalah SEM mikrograf dari media pertumbuhan tulang dengan variasi pencampuran alginat-kitosan 0%:100%, 10%:90%, 20%:80%, 30%:70%, 40%:60%, 50%:50%, 60%:40%, 70%:30%, 80%:20%, 90%:10%, dan 100%:0%, yang masing-masing mengandung karbonatapatit dengan massa yang tetap.

(a) Alginat : kitosan = 0% : 100%



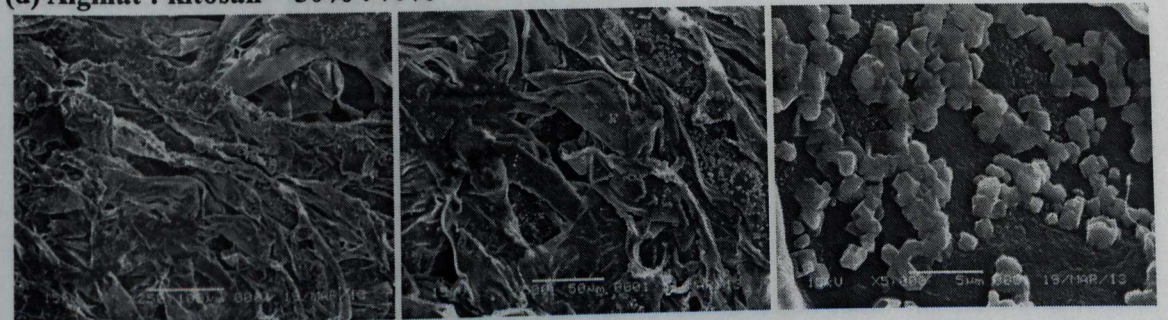
(b) Alginat : kitosan = 10% : 90%



(c) Alginat : kitosan = 20% : 80%



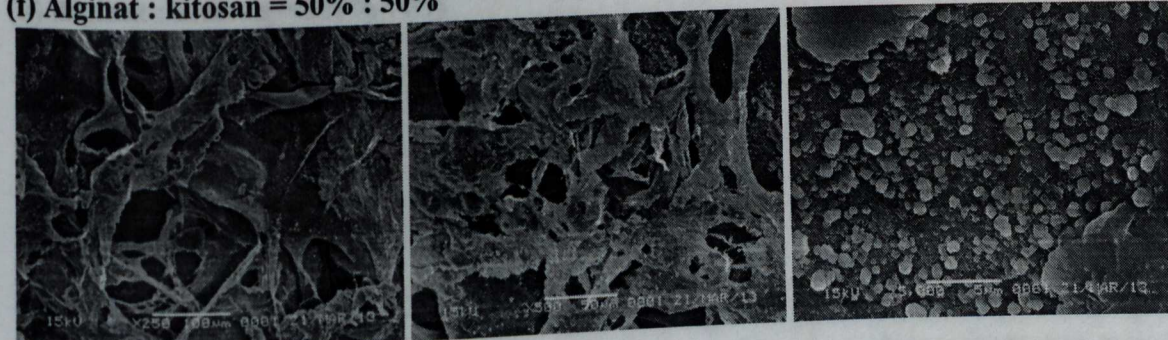
(d) Alginat : kitosan = 30% : 70%



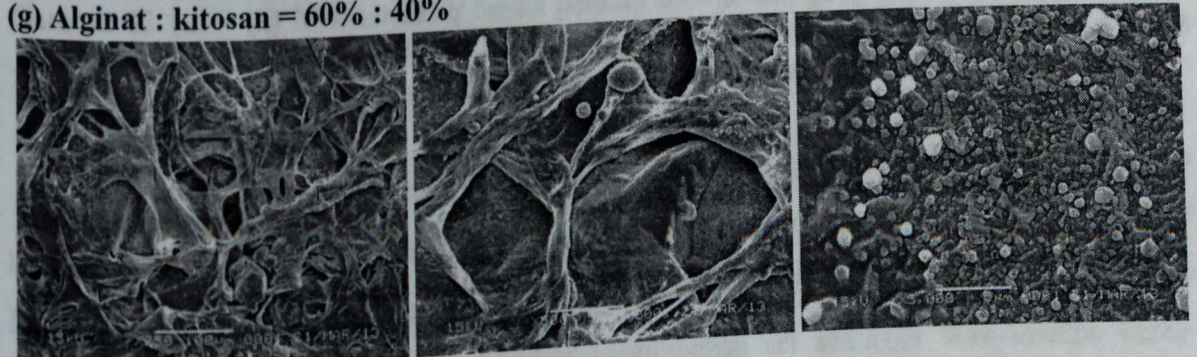
(e) Alginat : kitosan = 40% : 60%



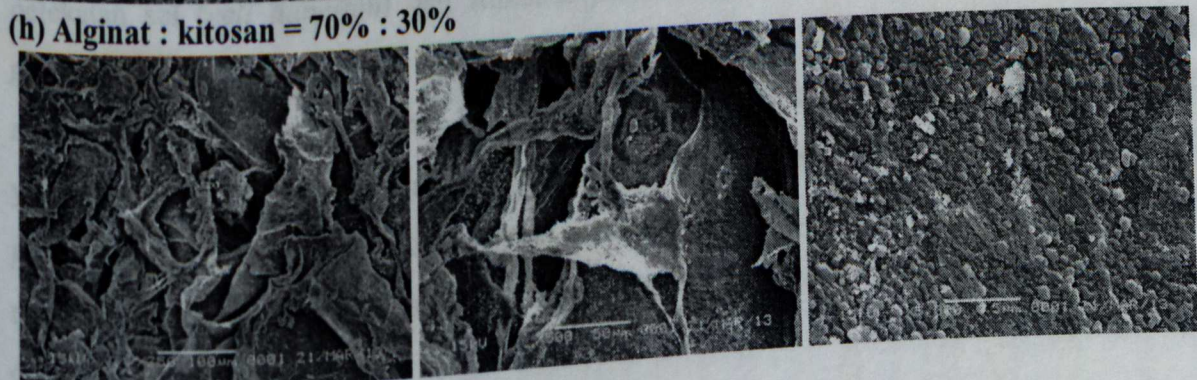
(f) Alginat : kitosan = 50% : 50%



(g) Alginat : kitosan = 60% : 40%



(h) Alginat : kitosan = 70% : 30%



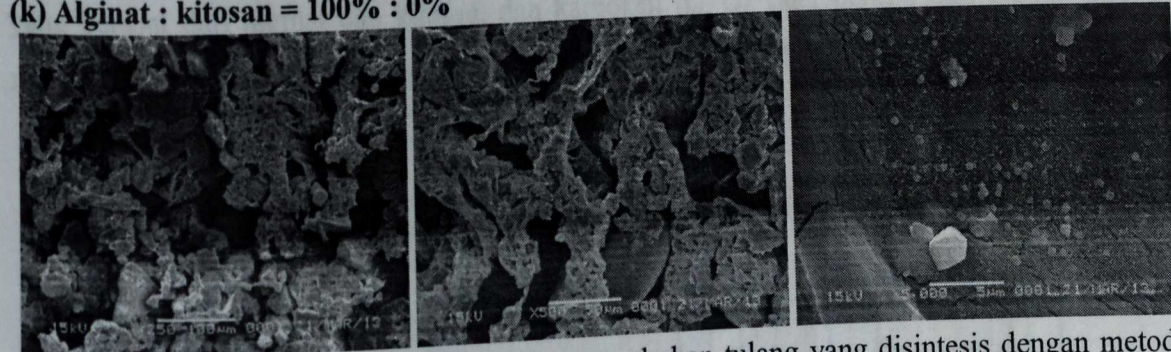
(i) Alginat : kitosan = 80% : 20%



(j) Alginat : kitosan = 90% : 10%

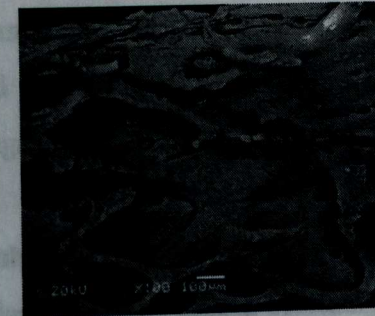


(k) Alginat : kitosan = 100% : 0%



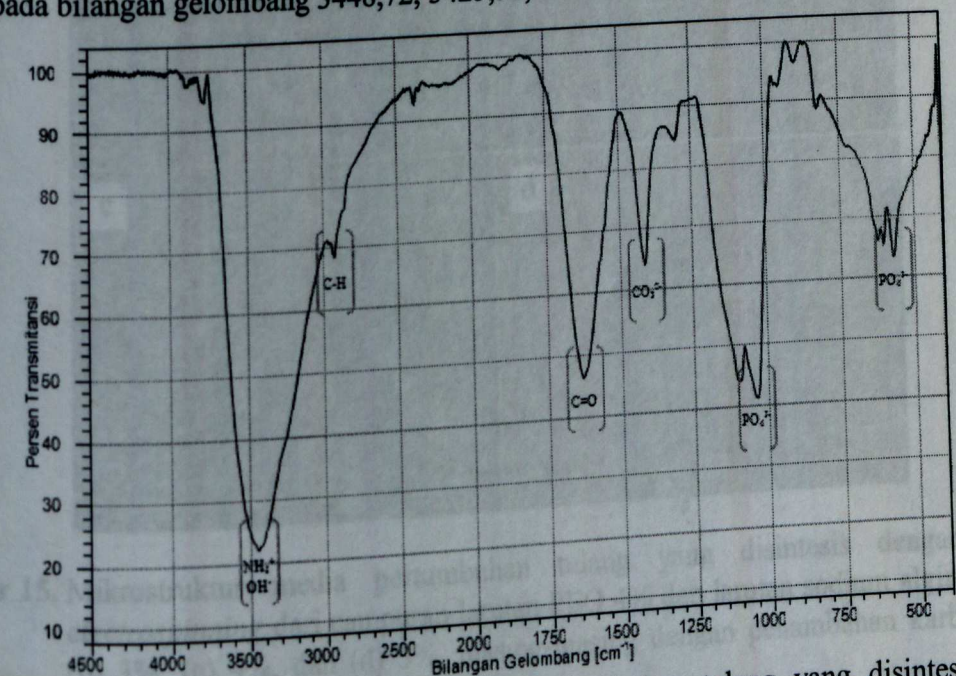
Gambar 12. (a) – (k) Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *freeze drying* dengan beberapa variasi pencampuran alginat-kitosan dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.

Dari Gambar 12 di atas, tampak jelas bahwa karbonatapatit telah terdispersi secara merata pada permukaan media pertumbuhan tulang. Keberadaan karbonatapatit yang bersifat bioaktif pada praktiknya berkaitan dengan inkorporasi jaringan lama dengan jaringan baru yang berupa pelekatan sel (*cell adhesion*) dan stimulasi pertumbuhan sel sehingga akan mampu meng-*generate* pertumbuhan tulang baru secara aktif. Metode *freeze drying* terbukti dapat menghasilkan media pertumbuhan tulang dengan sifat porus. Hal ini teramati dari hasil SEM yang menunjukkan bahwa ukuran pori yang terbentuk adalah bervariasi pada rentang 60 – 300 μm dimana ukuran ini menyerupai ukuran pori dari *cancellous/trabecular bone* dan tergolong mendukung proses pertumbuhan sel tulang. Mikrostruktur *cancellous/trabecular bone* dapat dilihat pada Gambar 13 berikut.



Gambar 13. Mikrostruktur *cancellous/trabecular bone* [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bertazzo_S_-_SEM_deproteinized_trabecular_-_wistar_rat_-_x100.tif]

Keberadaan karbonatapatit pada media pertumbuhan tulang ditunjukkan pula oleh hasil karakterisasi dengan metode *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy* yang ditandai oleh adanya gugus fungsi karbonat (CO_3^{2-}) pada bilangan gelombang $1411,89 \text{ cm}^{-1}$ dan gugus fungsi fosfat (PO_4^{3-}) pada bilangan gelombang 569 dan $1041,56 \text{ cm}^{-1}$. Tampak pula keberadaan gugus-gugus fungsi aktif lainnya yaitu amine (NH_3^+) yang berasal dari kitosan, hidroksil (OH^-) yang berasal dari alginat dan kitosan, dan karboksil (C=O) yang berasal dari alginat masing-masing pada bilangan gelombang $3448,72$, $3425,58$, dan $1629,85 \text{ cm}^{-1}$.



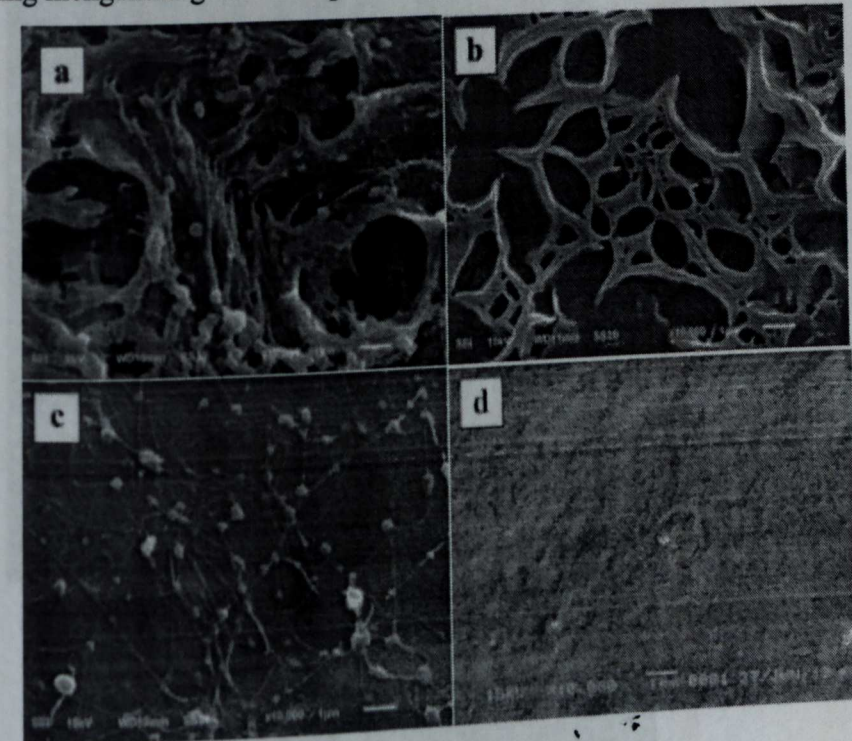
Gambar 14. Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *freeze drying*

Gugus hidroksil dan amine memegang peranan yang sangat penting sebagai pengikat karbonatapatit di permukaan media pertumbuhan tulang. Penggunaan kitosan dengan berat molekul yang tinggi menyebabkannya mampu mendispersikan karbonatapatit secara merata di permukaan media pertumbuhan tulang. Akan tetapi, kandungan kitosan yang semakin banyak justru menjadikan karbonatapatit cenderung “tenggelam” dan kurang begitu terlihat pada

permukaan media pertumbuhan tulang. Hal ini dapat terjadi karena sifat dari kitosan yaitu sebagai flokulan (penggumpal atau penyalut), selain sifat sebagai surfaktan (pengikat) dan dispersan (pendispersi) yang juga dimilikinya.

5.3. Sintesis Media Pertumbuhan Tulang Dengan Metode *Electrospinning*

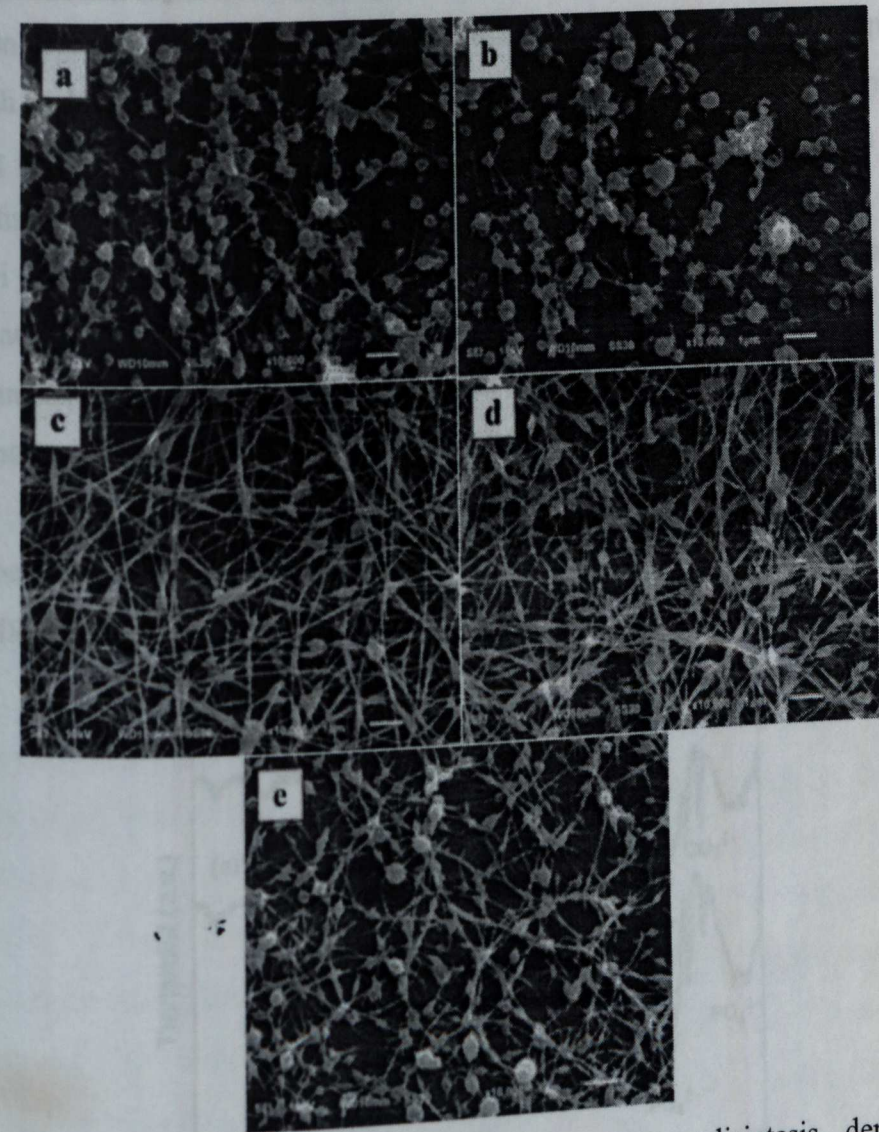
Media pertumbuhan tulang disintesis dengan mencampurkan larutan sodium alginat dan larutan PEO 4% (w/v) dengan volume pencampuran tertentu yang disertai dengan penambahan serbuk karbonatapatit. Untuk menghasilkan media pertumbuhan tulang yang berserat nano, pada penelitian ini digunakan metode *electrospinning*. Berikut ini adalah SEM mikrograf dari media pertumbuhan tulang dengan variasi konsentrasi larutan alginat 2, 3, 4, dan 5% (w/v), yang masing-masing mengandung karbonatapatit dengan massa yang tetap.



Gambar 15. Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *electrospinning* dari campuran larutan PEO 4% dan larutan sodium alginat (a) 2%, (b) 3%, (c) 4%, dan (d) 5%, masing-masing dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.

Pada saat penelitian, digunakan pula pencampuran menggunakan larutan alginat 1% akan tetapi dari ujung jarum *syringe* tidak menghasilkan serat. berdasarkan pengamatan yang dilakukan selama proses *electrospinning* berlangsung, yang tampak hanyalah tetesan larutan secara terus menerus yang menetes menuju ke plat konduktor. Pada Gambar 15 (a) tampak gumpalan berpori, sebagai ciri gumpalan yang terbentuk dari karbonat/hidroksi apatit.^[21] Hal ini menunjukkan bahwa penambahan alginat 2% masih belum cukup untuk menguraikan karbonat apatit menjadi polimer yang dapat dibentuk menjadi serat melalui jarum *syringe*. Penambahan

larutan sodium alginat 3% (Gambar 15 (b)) juga masih belum cukup untuk membentuk serat, meskipun terlihat ada kecenderungan gumpalan pada permukaan substrat telah membentuk jaringan seperti serat. Pada Gambar 15 (c) teramati adanya sejumlah serat dan manik-manik pada serat membentuk jaringan. Meskipun jumlah serat sangat sedikit, namun penambahan alginat 4% mampu menguraikan karbonat apatit menjadi serat. Penambahan lebih lanjut alginat 5% pada Gambar 15 (d) justru menghancurkan karbonat apatit, dan penyemprotan melalui jarum syringe justru menghasilkan semburan kabut. Hasil yang diperoleh hanya membentuk lapisan tipis pada permukaan substrat aluminium foil.



Gambar 16. Mikrostruktur media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *electrospinning* dari campuran larutan PEO 4% dan larutan kitosan (a) 1%, (b) 2%, (c) 3%, (d) 4%, dan (e) 5%, masing-masing dengan penambahan karbonatapatit dalam jumlah yang tetap.

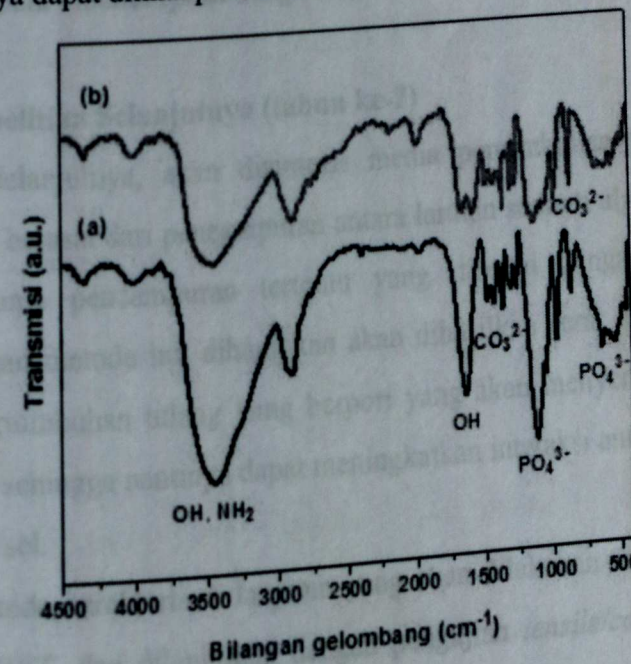
Dengan proses yang sama seperti di atas, dilakukan pula sintesis media pertumbuhan tulang dengan mencampurkan larutan kitosan dan larutan PEO 4% (w/v) dengan volume pencampuran tertentu yang disertai dengan penambahan serbuk karbonatapatit dengan massa

yang tetap. Konsentrasi larutan kitosan yang digunakan bervariasi, yaitu sebesar 1, 2, 3, 4, dan 5 % (w/v). SEM mikrograf dari media pertumbuhan tulang yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 16.

Pada penambahan larutan kitosan 1 dan 2%, serat yang terbentuk masih terputus-putus. Tampak adanya beads (butir-butir gumpalan) yang cukup banyak. Penambahan larutan kitosan 3% berhasil menumbuhkan serat-serat yang saling terjalin serta menurunkan jumlah beads yang muncul. Namun, peningkatan penambahan konsentrasi larutan kitosan (4 dan 5%) justru cenderung menurunkan jumlah serat yang terbentuk seiring dengan meningkatnya jumlah beads. Berdasarkan kegiatan penelitian ini dapat diindikasikan bahwa persentase optimum pembentukan serat adalah pada penggunaan larutan kitosan 3%, walaupun masih terlihat adanya beberapa beads yang tersebar pada serat. Semakin banyak jumlah beads pada sampel akan mengurangi efektifitas fungsi membran.

Dari hasil pengamatan menggunakan SEM yang ditunjukkan pada Gambar 15 dan 16 dapat diamati bahwa rentang ukuran diameter serat yang terbentuk adalah 56 – 72,8 nm. Rentang besaran diameter serat ini sudah cukup baik untuk membentuk membran. Namun, jumlah serat yang terbentuk masih perlu dioptimasi untuk dapat digunakan sebagai media penumbuh jaringan tulang.

Keberadaan gugus-gugus fungsi aktif pada sampel hasil sintesis diamati menggunakan metode FTIR. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 17 berikut.



Gambar 17. Spektra infra merah dari media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *electrospinning*. (a) sampel dengan penggunaan larutan kitosan 3%, (b) sampel dengan penggunaan larutan sodium alginat 4%.

Secara umum, spektrum FTIR pada kedua sampel tersebut menunjukkan pola yang mirip, kecuali adanya puncak spektrum pada sampel yang menggunakan larutan kitosan 3% di bilangan gelombang 1520 cm^{-1} , yang merupakan gugus NH_3^+ dari kitosan. Disamping itu, transmisi infra-merah dari gugus-gugus ikatan pada sampel tersebut memiliki intensitas yang lebih tinggi. Kemiripan pola transmisi kedua sampel tersebut ditandai oleh puncak-pita transmisi yang lebar dengan puncak pada bilangan gelombang antara $3417,86$ sampai $3442,94\text{ cm}^{-1}$, dan $1641,42\text{ cm}^{-1}$ dan $1627,92\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan absorpsi infra merah dari gugus ikatan OH^- yang berasal dari alginat dan kitosan. Tiga puncak pada 1487 cm^{-1} , 1413 cm^{-1} dan 842 cm^{-1} merupakan absorpsi dari gugus fungsi karbonat (CO_3^{2-}). Sedangkan pita lebar yang berpuncak pada 1099 cm^{-1} dan 619 cm^{-1} merupakan absorpsi gugus fungsi fosfat (PO_4^{3-}). Kedua gugus fungsi terakhir mengindikasikan keberadaan karbonatapatit.

Dari hasil SEM dan FTIR terlihat pembentukan serat terlihat pada sampel dengan bahan alginat 4%, kitosan 3% sampai 5%. Dengan volume larutan PEO dan jumlah karbonatapatit yang ditambahkan adalah sama, variasi komposisi alginat untuk menghasilkan serat lebih sempit cakupannya dibandingkan dengan kitosan. Ini dikarenakan sifat alginat yang sulit berikatan (*crosslink*) dengan senyawa lain seperti PEO dan kadar karbonatapatit yang ditambahkan terlalu banyak. Hal ini teramati pada hasil FTIR yang menunjukkan karbonatapatit yang terserap oleh sampel membran alginat lebih banyak daripada kitosan tetapi hasil serat yang terbentuk pada sampel kitosan lebih baik dibandingkan dengan alginat.

5.4. Tahapan Penelitian Selanjutnya (tahun ke-2)

Pada tahap selanjutnya, akan disintesis media pertumbuhan tulang dengan metode *electrospinning* yang berasal dari pencampuran antara larutan sodium alginat dan larutan kitosan dengan variasi volume pencampuran tertentu yang disertai dengan penambahan serbuk karbonatapatit. Dengan metode ini, diharapkan akan dihasilkan serat dalam ukuran nano serta dihasilkan media pertumbuhan tulang yang berpori yang akan menyerupai bentuk lingkungan mikro dari sel tulang sehingga nantinya dapat meningkatkan interaksi antarmuka dan mendukung terjadinya proliferasi sel.

Beberapa metode karakterisasi lanjutan yang akan dilakukan adalah SEM, XRD, EDS, FTIR, TEM, PSA, BET, dan dilanjutkan dengan pengujian *tensile/compressive strength* dari media pertumbuhan tulang dari proses yang dilakukan dengan metode *freeze drying* dan *electrospinning*. Pengujian biologi yang akan dilakukan adalah pengujian secara pra-pra-klinik (*in-vitro*) yang meliputi uji sitotoksik, uji aktivitas *alkaline phosphatase* (ALP), uji biodegradasi, dan proliferasi sel, serta pengujian secara pra-klinik (*in-vivo*).

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Telah dihasilkan media pertumbuhan tulang berbasis polimer alam dan biokeramik dengan metode *freeze drying*. SEM mikrograf menunjukkan bahwa media yang dihasilkan dengan metode *freeze drying* memiliki ukuran pori yang bervariasi pada rentang 60 – 300 μm , dimana ukuran ini menyerupai ukuran pori dari *cancellous/trabecular bone* dan tergolong mendukung proses pertumbuhan sel tulang. Karbonatapatit terlihat telah terdispersi secara merata pada permukaan media. Keberadaan karbonatapatit pada media pertumbuhan tulang didukung oleh hasil karakterisasi dengan metode *Fourier Transform Infra Red (FTIR Spectroscopy)* yang ditandai oleh adanya gugus fungsi karbonat (CO_3^{2-}) pada bilangan gelombang 1411,89 cm^{-1} dan gugus fungsi fosfat (PO_4^{3-}) pada bilangan gelombang 569 dan 1041,56 cm^{-1} .
2. Telah dihasilkan media berpori menggunakan metode *electrospinning* dengan material penyusun: larutan kitosan-larutan PEO-karbonatapatit dan larutan sodium alginat-larutan PEO-karbonatapatit. Berdasarkan hasil SEM dan FTIR, komposisi larutan kitosan yang bisa menghasilkan serat lebih bervariasi yaitu pada konsentrasi 3 – 5% (w/v) dengan komposisi yang lebih baik pada konsentrasi 3%. Sedangkan alginat hanya memiliki variasi komposisi yang sempit yaitu pada konsentrasi 4%. Rentang ukuran diameter serat terbentuk yang teramati adalah 56 – 72,8 nm. Selain serat, terdapat pori-pori yang terlihat pada komposisi kitosan 3 – 5% dan pada sampel alginat ditemukan pada komposisi 2 – 4%. Proses *electrospinning* tidak merubah komposisi bahan penyusun sampel, hal ini tampak dari hasil FTIR yang menunjukkan keberadaan gugus fungsi dari bahan-bahan penyusun tersebut.

6.2. Saran

Berikut ini adalah beberapa saran yang diajukan untuk kelanjutan penelitian ini:

1. Perlu dilakukan pengamatan dan pengujian yang lebih detail untuk mengetahui komposisi pencampuran yang optimal antara larutan sodium alginat dan larutan kitosan untuk aplikasinya sebagai media pertumbuhan tulang yang disintesis dengan metode *freeze drying* dan *electrospinning*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Purwasasmita, B.S., Lestari, G.M., Prastomo, N., Edwin, F., *Effect of Tetracalcium Phosphate and Dicalcium Phosphate Molar Ratio and Addition of Chitosan As Gelling Agent On Synthesis of Calcium Phosphate Cement Paste*, Bionatura, 13(1), 66-78, 2011.
- [2] Haiguang Zhao, Lie Ma, Changyou Gao, Jiacong Shen. 2008. *Fabrication and Properties of Mineralized Collagen-Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds*. Polymers For Advanced Technologies, 19, 1590-1596.
- [3] Geun Hyung Kim, Taijin Min, Su A Park, Wan Doo Kim. 2008. *Coaxially Electrospun Micro/Nanofibrous Poly(ϵ -Caprolactone)/Eggshell-Protein Scaffold*. Bioinspiration and Biomimetics, 3, 016006 (8pp).
- [4] Eric M. Rivera, Miguel Araiza, Witold Brostow, Victor M. Castano, J.R. Diaz Estrada, R. Hernandez, J. Rogelio Rodriguez. 1999. *Synthesis of Hydroxyapatite From Eggshells*. Materials Letter, 41, 128-134.
- [5] Qing-Lei Qi, Qiang Li, Jian-Wei Lu, Zhao-Xia Guo, Jian Yu. 2009. *Preparation and Characterization of Soluble Eggshell Membrane Protein/Chitosan Blend Films*. Chinese Journal of Polymer Science, 27, No. 3, 387-392.
- [6] Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2009. *Garis Pantai Indonesia Terpanjang Keempat di Dunia*. <http://www.kkp.go.id/index.php/arsip/c/1048/Garis-Pantai-Indonesia-Terpanjang-Keempat-di-Dunia/> [diakses pada tanggal 23 Juli 2012].
- [7] Ho-Wang Tong, Min Wang, Zhao-Yang Li, William W Lu. 2010. *Electrospinning, Characterization and In Vitro Biological Evaluation of Nanocomposite Fibers Containing Carbonated Hydroxyapatite Nanoparticles*. Biomedical Materials, 5, 054111 (13pp).
- [8] Zhensheng Li, Hassna R. Ramay, Kip D. Hauch, Demin Xiao, Miqin Zhang. 2005. *Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds For Bone Tissue Engineering*. Biomaterials, 26, 3919-3928.
- [9] Sylvain Deville, Eduardo Saiz, Antoni P. Tomsia. 2006. *Freeze Casting of Hydroxyapatite Scaffolds For Bone Tissue Engineering*. Biomaterials, 27, 5480-5489.
- [10] Travis J. Sill, Horst A. von Recum. 2008. *Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering*. Biomaterials, 29, 1989-2006.
- [11] Jian Wei Lu, Yong Liang Zhu, Zhao Xia Guo, Ping Hu, Jian Yu. 2006. *Electrospinning of Sodium Alginate With Poly(Ethylene Oxide)*. Polymer, 47, 8026-8031.
- [12] Dr. Pikal, M., Reiter, C. 2008. *Basic Theory of Freeze Drying*.
- [13] W.S. Dai, T.A. Barbari. 1999. *Hydrogel Membranes With Mesh Size Asymmetry Based on The Gradient Crosslinking of Poly(Vinyl Alcohol)*, Journal of Membrane Science, 156, 67-79.
- [14] W.J. Elford. 1937. *Principles Governing the Preparation of Membranes Having Graded Porosities. The Properties of 'Gradocol' Membranes as Ultrafilters*. Transactions of the Faraday Society, 33, 1094-1104.
- [15] Yijing Guan. 2010. *Characterization of Alginat Scaffold Using X-Ray Imaging Techniques*. Master thesis of University of Saskatchewan, Canada.
- [16] H. Matsumoto and A. Tanioka. 2011. *Functionality in Electrospun Nanofibrous Membranes Based on Fiber's Size, Surface Area, and Molecular Orientation*. Membranes, vol. 1, 249-264.
- [17] R. F. Egerton. 2005. *The Scanning Electron Microscope*. in *Physical Principal of Electron Microscopy*. New York, USA: Springer Science and Business Media, ch. 5, 126-135.
- [18] S. Panboon. 2005. *Electrospinning of Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan Fibers for Wound Dressing Applications*. Thesis of King Mongkut's Institute of Technology, North Bangkok.

- [1] Bawazwan, H.S., Lestari, G.M., Prasanna, N., Bawa, E., Effect of Temperature, pH, and Electrostatic Interaction on the Formation of Calcium Phosphate Nanoparticles and its Application in Drug Delivery. *Journal of Nanoparticles*, 2011, 2011.
- [2] Huang, Z., Liu, M., Chang, G., et al. 2008. Fabrication and Properties of Electrospun Collagen-Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds for Advanced Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 1590-1596.
- [3] Gao, H., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [4] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [5] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [6] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [7] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [8] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [9] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [10] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [11] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [12] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [13] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [14] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [15] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [16] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [17] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [18] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [19] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [20] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.
- [21] Liu, M., Yang, L., Jin, M., et al. 2008. Coaxially Electrospun Polylactide/Polyglycolide/Poly(D,L-lactide) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84, 6160-6166.

- [19] S. I. Jeong, et al. 2010. *Electrospun Chitosan-Alginate Nanofibers with In Situ Polyelectrolyte Complexation for Use as Tissue Engineering Scaffolds*. *Journal of Tissue Engineering*.
- [20] T. J. Sill and H. A. Von Recum. 2008. *Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering*. *Biomaterials*, vol. 29, 1989-2006.
- [21] Z. Li, H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, and M. Zhang. 2005. *Chitosan-Alginate Hybrid Scaffold for Bone Tissue Engineering*. vol. 26, 3919-3928.



